



Генная терапия наследственных заболеваний на основе аденоассоциированных вирусных векторов: современные проблемы применения и пути их решения

Т.В. Егорова^{1,2}, А.А. Пискунов³, Д.А. Потеряев³, ✉

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, ул. Вавилова, д. 34/5, Москва, 119334, Российская Федерация

² ООО «Марлин Биотех», Триумфальный проезд, д. 1, пгт. Сириус, Краснодарский край, 354340, Российская Федерация

³ Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Потеряев Дмитрий Александрович; poteryaev@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время генная терапия на основе аденоассоциированных вирусов (adeno-associated viruses, AAV) сталкивается с рядом барьеров биомедицинского и технологического характера, анализ и преодоление которых необходимо для дальнейшего развития данного направления генной терапии.

ЦЕЛЬ. Провести анализ применения генной терапии ряда наследственных заболеваний с учетом ограничений, связанных с побочными эффектами или недостаточной эффективностью генной терапии, проблемой определения терапевтического окна и индивидуальной спецификой наследственного заболевания, а также рассмотреть подходы для снятия этих ограничений и повышения доступности генной терапии путем усовершенствования технологических подходов производства и снижения себестоимости генотерапевтических препаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ. Рассмотрен опыт применения одобренных и находящихся на этапе клинических исследований генотерапевтических препаратов. Проведена оценка применимости генной терапии на примере ряда наследственных заболеваний и показано, что правильное определение терапевтического окна препаратов и своевременная диагностика наследственных заболеваний являются критически важными для эффективной и безопасной генной терапии. Рассмотрены современные стратегии снижения риска возникновения побочных эффектов и увеличения эффективности генной терапии на основе AAV, среди которых наиболее важны следующие: поиск новых серотипов AAV, модификация капсидов и генома AAV, подавление нецелевой экспрессии с помощью микроРНК, изменение содержания CpG, поиск новых промоторов для трансгена. Проведен анализ развития технологии производства генотерапевтических препаратов на основе AAV. Наиболее перспективным представляется переход на суспензионное культивирование, усовершенствование биореакторов, применение новых методов и материалов очистки вирусных частиц, усовершенствование систем трансфекции и создание новых клеточных линий-продуцентов, что в конечном счете может привести к снижению затрат на производство препаратов и повышению доступности генной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В настоящее время генная терапия используется только для небольшого количества наследственных заболеваний. Существенные ограничения применения генотерапевтических препаратов связаны с недостаточной эффективностью, риском возникновения побочных эффектов и высокой стоимостью лечения. Ведущиеся в настоящее время биомедицинские и технологические разработки позволят решить указанные проблемы и повысить доступность генной терапии.

Ключевые слова: генная терапия; генотерапевтический лекарственный препарат; аденоассоциированный вирус; AAV; аденоассоциированные вирусные векторы; наследственные заболевания; гемофилия; миодистрофия Дюшенна; эффективность генной терапии; безопасность генной терапии; технология производства AAV; модификация AAV; трехплазмидная технология; очистка вирусных частиц AAV

Для цитирования: Егорова Т.В., Пискунов А.А., Потеряев Д.А. Генная терапия наследственных заболеваний на основе аденоассоциированных вирусных векторов: современные проблемы применения и пути их решения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):123–139. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-123-139>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы являются сотрудниками компаний, занимающихся разработкой генотерапевтических лекарственных средств. Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной и медицинской ценности обсуждаемых материалов и заявляют о беспристрастности оценки рассмотренных данных.

Adeno-associated virus vector-based gene therapy for hereditary diseases: current problems of application and approaches to solve them

Tatiana V. Egorova^{1,2}, Aleksandr A. Piskunov³, Dmitry A. Poteryaev³, ✉

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov St., Moscow 119334, Russian Federation

² Marlin Biotech LLC, 1 Triumfalny Dr., Sirius urban-type settlement, Krasnodar Region 354340, Russian Federation

³ GENERIUM JSC, 14 Vladimirsкая St., Volginsky, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Dmitry A. Poteryaev; poteryaev@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, gene therapy based on adeno-associated virus (AAV) vectors faces a number of barriers, both biomedical and technological, which require studying and overcoming for further development of this gene therapy technology.

AIM. This study aimed to analyse the use of gene therapy for a range of hereditary diseases, taking into account the barriers associated with its side effects and insufficient efficacy, the determination of the therapeutic window, and individual characteristics relevant to a particular hereditary disease; additionally, the study aimed to review the approaches to lifting these barriers and increasing the availability of gene therapy through the improvement of technological approaches to production and the reduction of production costs.

DISCUSSION. The authors reviewed the experience accumulated for gene therapy products that were approved or undergoing clinical trials. The study included a gene therapy applicability assessment using several hereditary diseases as a case study. The assessment showed that correct determination of the therapeutic window for a medicinal product and timely diagnosis of a hereditary disease were essential for effective and safe gene therapy. The study considered the strategies used to reduce the risks of adverse events and increase the effectiveness of AAV-based gene therapy. The authors assessed technological advancements in the manufacturing of AAV-based gene therapy products. The most perspective directions were the transition to suspension culture systems, the improvement of bioreactors, the use of new methods and materials for the purification of viral particles, the improvement of transfection systems, and the creation of new host cell lines. Ultimately, this can lead to lower production costs and an increased availability of gene therapy.

CONCLUSION. Currently, gene therapy is used only for a small range of hereditary diseases. Significant barriers to its use are due to insufficient efficacy, risks of adverse events, and high costs for treatment. Ongoing biomedical and technological development should lift many of these barriers and increase access to gene therapy.

Keywords: gene therapy; gene therapy product; adeno-associated virus; AAV; adeno-associated virus vectors; hereditary diseases; haemophilia; Duchenne muscular dystrophy; gene therapy efficacy; gene therapy safety; AAV production technology; AAV modification; triple-plasmid transfection; AAV-particle purification

For citation: Egorova T.V., Piskunov A.A., Poteryaev D.A. Adeno-associated virus vector-based gene therapy for hereditary diseases: current problems of application and approaches to solve them. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):123–139. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-123-139>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors are employees of companies involved in the development of gene therapy products. However, when writing the manuscript, the authors were guided by considerations of the scientific and medical value of the data discussed and declare impartiality in the assessment of the data reviewed.

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия (ГТ) направлена на манипуляцию экспрессией определенного гена или на изменение биологических свойств живых клеток в терапевтических целях¹. В свою очередь, генотерапевтические лекарственные препараты (ГенЛП) – лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности². Основные группы ГенЛП – это вирусные частицы, служащие генетическим вектором, ДНК-олигонуклеотиды и малые интерферирующие РНК, модулирующие экспрессию генов. В данном обзоре авторы осветили направление ГТ с использованием векторов на основе аденоассоциированных вирусов (adeno-associated viruses, AAV).

Несмотря на десятилетия развития данного вида ГТ для лечения наследственных заболеваний, широкому применению ГенЛП препятствует ряд объективных факторов. Одним из значимых факторов является исключительно высокая стоимость, несмотря на то что в большинстве случаев предполагается однократное применение ГенЛП. К другим ограничивающим факторам относятся барьеры биомедицинского характера, такие как небезопасность применения ГенЛП, связанная в первую очередь с иммуногенностью,

ограничения полезной нагрузки в использующихся AAV векторах, недостаточная эффективность целевой доставки и экспрессии трансгена и др. В ряде случаев сопутствующие заболевания, история предшествующей терапии, возраст, упущенное или неоптимальное терапевтическое окно, существующая эффективная и безопасная стандартная терапия также препятствуют применению даже уже одобренного ГенЛП. Экспертная оценка регистрационного досье ГенЛП также представляет собой сложную задачу, особенно в условиях его неполной характеристики по сравнению с традиционными лекарственными средствами [1]. Наконец, технология производства ГенЛП на основе вирусных частиц характеризуется исключительно высокой себестоимостью в расчете на дозу. Данный обзор посвящен описанию этих барьеров и поиску путей их преодоления.

Цель работы – провести анализ применения генной терапии ряда наследственных заболеваний с учетом ограничений, связанных с побочными эффектами или недостаточной эффективностью генной терапии, проблемой определения терапевтического окна и индивидуальной спецификой наследственного заболевания, а также рассмотреть подходы для снятия этих ограничений и повышения доступности генной терапии путем усовершенствования технологических подходов производства и снижения себестоимости генотерапевтических препаратов.

¹ Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). Guidance for industry. 2008-D-0205. FDA; 2020.

² Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Медицинские и биологические ограничения к использованию генотерапевтических препаратов

В настоящее время зарегистрировано несколько ГенЛП для доставки экспрессионных конструкций *in vivo*, которые в большинстве являются препаратами для терапии наследственных заболеваний (табл. 1).

Для терапии гемофилии А применяется однократная инъекция препарата Роктавиан (валоктоген роксапаровек). AAV вектор, применяемый в составе препарата, обеспечивает экспрессию функционального фактора свертываемости крови VIII-SQ (FVIII) в клетках печени. Однако следует отметить, что использование препарата ограничено рядом факторов. Во-первых, препарат не полностью исключил зависимость пациентов от инъекционных факторов свертываемости. Годовая частота кровотечений снизилась с 5,4 до 2,6 случая в год, а среднее число инфузий препаратов свертываемости — со 136 до 5. Время наблюдения после применения ГенЛП составило 3 года³, и пока неизвестно, насколько стабильной будет экспрессия FVIII в долгосрочной перспективе. Вполне вероятно, что может произойти падение уровня трансгенного FVIII и пациент снова будет зависимым от частых инфузий факторов свертываемости. Применение препарата Роктавиан, как и других AAV, имеющих тропизм к клеткам печени, не показано у детей, поскольку их печень еще растет. Также этой терапии не подлежат пациенты, имеющие антитела к серотипу AAV5, а также с хроническими заболеваниями печени, поскольку ГенЛП обладает выраженной гепатотоксичностью. Последнее является серьезным ограничивающим фактором, так как большинство пациентов гемофилией старше 20 лет в России страдают хроническим гепатитом С. Это связано с тем, что до 2005 г. больные гемофилией получали лечение компонентами крови, не прошедшими вирусную инактивацию⁴. Практически все пациенты, получившие Роктавиан, были вынуждены пройти курс иммуносупрессивной терапии для предотвращения аутоиммунной реакции организма, вызванной введением AAV. Опрос участников клинического исследования (КИ) препарата Роктавиан выявил, что для некоторых иммуносупрессивная терапия, которую они получали во время участия в исследовании, либо в профилактических целях, либо для лечения трансамината, была наименее переносимой

частью исследования [2]. Существенная доля пациентов с гемофилией имеет ее ингибиторную форму, характеризующуюся высоким уровнем нейтрализующих антител, например к FVIII, что делает применение ГенЛП неэффективным. Такие пациенты переводятся на терапию препаратами шунтирующего действия (FVII, эмицизумаб), позволяющую запустить каскад свертывания крови в обход FVIII.

Гемофилия является примером, когда эффективная и безопасная ферментозаместительная терапия факторами свертываемости крови или препаратами шунтирующего действия позволяет контролировать болезнь и обеспечивать приемлемое качество жизни пациентов и в отсутствие ГТ. В данном случае ГТ должна доказать свою долгосрочную эффективность и безопасность, а главное, иметь стоимость существенно ниже, чем сейчас, чтобы стать стандартом лечения.

Другими примерами эффективной ферментозаместительной терапии, которая делает назначение ГТ по тому же показанию всего лишь одной из альтернатив, являются некоторые лизосомные болезни накопления (например, болезнь Гоше, Фабри и др.). Однако есть большое количество наследственных заболеваний, где ферментозаместительная терапия невозможна по определению и где только доставка функциональной копии гена в пораженные клетки (или иной способ коррекции мутации) может быть патогенетической терапией. К заболеваниям такого типа относится, например, миодистрофия Дюшенна (МДД).

Одной из серьезных проблем ГТ является недостаточная для восстановления нормального уровня экспрессии гена доза AAV, что связано с ограничением дозы по токсичности, или падение уровня экспрессии со временем. Последнее может иметь различные причины: рост целевой ткани (как отмечалось выше для печени), естественная гибель клеток, иммунный ответ организма, транскрипционный сайленсинг трансгена. Кроме этого, недостаточная эффективность и безопасность ГТ может иметь менее очевидные причины, что может быть проиллюстрировано на примере препарата Лукстурна.

Лукстурна (воретиген непаровек) — первый ГенЛП, одобренный для лечения наследственной дегенерации сетчатки, вызванной биаллельными мутациями в гене *RPE65*. При проведении КИ, включая наблюдательные пострегистрационные,

³ <https://www.roctavian.com/en-us/roctavian-results/>

⁴ <https://medvestnik.ru/content/news/Bolee-90-bolnyh-gemofiliei-starshe-18-let-stradaut-hronicheskim-gepatitom-S.html>

Таблица 1. Одобренные к применению генотерапевтические лекарственные препараты (ГенЛП)

Table 1. Approved gene therapy products (GTP)

Наименование ГенЛП <i>GTP name</i>	Показание <i>Indication</i>	Описание, вектор доставки <i>Description, delivery vector</i>	Промо- тор <i>Promoter</i>	Доза <i>Dose</i>	Год одобре- ния FDA/EMA <i>Year of FDA/ EMA approval</i>	Стоимость ⁵ терапии <i>List price⁵</i>
Глибера (алипоген типарвовек) ⁶ <i>Glybera (alipogene tiparvovec)⁶</i>	Наследственный дефицит липопро- теинлипазы (гипер- липотеинемия I типа) <i>Familial lipoprotein lipase deficiency (hyperlipoproteinaemia type I)</i>	В/м инъекция гена липопротеинлипазы, AAV2 <i>I.m. injection of the lipoprotein lipase gene, AAV2</i>	CMV	1х10 ¹² гк/кг <i>1×10¹² gc/kg</i>	2012*	– (регистраци- онное удосто- верение не продлено) – (marketing authorisation not renewed)
Лукстурна (воретиген непарвовек) ⁷ <i>Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl)⁷</i>	Пигментный ретинит (наследственная дистрофия сетчатки, вызванная мутацией RPE65) <i>Congenital retinitis pigmentosa (inherited blindness due to RPE65 mutations)</i>	Внутриглазная доставка функцио- нального гена RPE65, AAV2 <i>Intra-ocular delivery of the functional RPE65 gene, AAV2</i>	CAG	1,5×10 ¹¹ гк/глаз <i>1.5×10¹¹ gc/eye</i>	2017	425 000 долла- ров США <i>425,000 USD</i>
Золгенсма ⁸ (онасемноген абепарвовек) <i>Zolgensma⁸ (onasemnogene abeparvovec-xioi)</i>	Спинальная мышеч- ная атрофия, вызван- ная мутациями SMN1 <i>Spinal muscular atrophy due to SMN1 mutations</i>	В/в инфузия функци- онального гена SMN1, AAV9 <i>I.v. infusion of the functional SMN1 gene, AAV9</i>	CAG	1,1×10 ¹⁴ гк/кг <i>1.1×10¹⁴ gc/kg</i>	2019	2 100 000 долла- ров США <i>2,100,000 USD</i>
Элевидис ⁹ (деландистро- ген моксепар- вовек) <i>Elevidys⁹ (delandistrogene moxeparvovec- rokl)</i>	Мышечная дистро- фия Дюшенна <i>Duchenne muscular dystrophy</i>	В/в инфузия функци- онального минигена DMD, AAVrh74 <i>I.v. infusion of the functional DMD minigene, AAVrh74</i>	МНСК7	1,33×10 ¹⁴ гк/кг <i>1.33×10¹⁴ gc/kg</i>	2023*	3 200 000 долла- ров США <i>3,200,000 USD</i>
Роктавиан ¹⁰ (валоктокоген роксапарвовек) <i>Roctavian¹⁰ (valoctocogene roxaparvovec- rvox)</i>	Гемофилия А <i>Haemophilia A</i>	В/в инфузия функ- ционального гена фактора FVIII, AAV5 <i>I.v. infusion of the functional FVIII gene, AAV5</i>	HLP	6×10 ¹³ гк/кг <i>6×10¹³ gc/kg</i>	2023*	2 900 000 дол- ларов США <i>2,900,000 USD</i>
Гемгеникс ¹¹ (этранакоген дезапарвовек) <i>Hemgenix¹¹ (etranacogene dezaparvovec- drlb)</i>	Гемофилия В <i>Haemophilia B</i>	В/в инфузия функ- ционального гена фактора FIX, AAV5 <i>I.v. infusion of the functional FIX gene, AAV5</i>	LP1	2×10 ¹³ гк/кг <i>2×10¹³ gc/kg</i>	2022*	3 500 000 долла- ров США <i>3,500,000 USD</i>
Виджувек ¹² (беремаген геперпавек) <i>Vyjuvek¹² (beremagene geperpavec-svdt)</i>	Дистрофический бул- лезный эпидермолиз, вызванный мутация- ми гена COL7A1 <i>Dystrophic epidermolysis bullosa due to mutations in the COL7A1 gene</i>	Топическая накожная доставка функцио- нального гена колла- гена COL7A1, HSV-1 <i>Topical cutaneous delivery of the functional collagen gene COL7A1, HSV-1</i>	COL7A1	4×10 ⁸ – 1,2×10 ⁹ БОЕ <i>4×10⁸– 1.2×10⁹ PFU</i>	2023*	24 250 долларов США за упаковку (631 000 – на пациента в год) <i>24,250 USD per vial (631,000 USD per patient per year)</i>

⁵ <https://www.globaldata.com/>⁶ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/glybera-epar-public-assessment-report_en.pdf⁷ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/luxturna>⁸ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf⁹ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/tissue-tissue-products/elevydys>¹⁰ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/roctavian-epar-public-assessment-report_en.pdf¹¹ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/hemgenix-epar-public-assessment-report_en.pdf¹² <https://www.fda.gov/media/169435/download>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Наименование ГенЛП <i>GTP name</i>	Показание <i>Indication</i>	Описание, вектор доставки <i>Description, delivery vector</i>	Промо- тор <i>Promoter</i>	Доза <i>Dose</i>	Год одобре- ния FDA/EMA <i>Year of FDA/ EMA approval</i>	Стоимость терапии <i>List price</i>
Неоваскулген ¹³ <i>Neovasculgen</i> ¹³	Ишемия нижних конечностей ате- росклеротического генеза <i>Atherosclerotic ischaemia of the lower limbs</i>	В/м введение гена фактора роста сосудов VEGF-165, плазмиды <i>I.m. injection of the vascular growth factor gene VEGF-165, plasmid</i>	CMV	1,2 мг <i>1.2 mg</i>	2011	78 600 рублей <i>78,600 ₺</i>
Апстаза ¹⁴ (эладокаген экспуарвовек) <i>Upstaza</i> ¹⁴ <i>(eladocagene exuparvovec)</i>	Дефицит декарбок- силазы ароматиче- ских L-аминокислот <i>Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency</i>	Введение внутри базального ядра го- ловного мозга AAV2 с геном декарбокси- лазы <i>Intrapataminal delivery of the decarboxylase gene, AAV2</i>	CMV	1,8×10 ¹¹ гк (общая доза) <i>1.8×10¹¹ gc (total dose)</i>	2022*	3 710 000 долларов США <i>3,710,000 USD</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. * — не зарегистрирован в Российской Федерации; в/м — внутримышечно; в/в — внутривенно; AAV — вектор на основе аденоассоциированного вируса; HSV-1 — вектор на основе человеческого вируса герпеса 1 типа; гк — геномные копии; БОЕ — бляшкообразующие единицы.

Note. *, not approved in Russia; i.m., intramuscular; i.v., intravenous; AAV, adeno-associated virus vector; HSV-1, human herpes simplex type 1 virus vector; gc, genome copies; PFU, plaque forming units.

препарат продемонстрировал приемлемый профиль безопасности и эффективность, позволяя не только остановить прогрессию заболевания, но и во многих случаях даже частично восстановить уже утраченное зрение. Необходимо отметить, что период наблюдения самого масштабного к настоящему моменту пострегистрационного КИ (103 пациента) не превышал 2,3 года [3]. Эта ГТ проводится в виде субретинальной инъекции AAV, несущего функциональный ген *RPE65*. Ген *RPE65* играет ключевую роль в обновлении 11-цис-ретинола, необходимого для функционирования фоторецепторов сетчатки — палочек. Первичная терапевтическая мишень Лукстурна — клетки пигментного эпителия сетчатки, а фоторецепторы являются вторичной мишенью с точки зрения восстановления зрительной функции [4].

После одобрения препарата Лукстурна появились сообщения о хориоретинальной атрофии (ХРА) после применения ГТ, как вокруг места ретиномии (места введения препарата), так и около крупных сосудов сетчатки. ХРА — это атрофия наружных слоев сетчатки, пигментного эпителия и хориокапиллярного слоя сосудистой оболочки сетчатки. Рост очагов ХРА наблюдался в течение нескольких месяцев, особенно у наиболее молодых пациентов, у которых изначально наблюдались наилучшие показатели эффективности ГТ. Степень прогрессии ХРА после

введения препарата Лукстурна превышала естественное течение заболевания при сравнении с историческими морфологическими параметрами пациентов, не получавших данную ГТ. Были исключены несколько причин ХРА, такие как последствия хирургического вмешательства в процессе введения препарата или иммунный ответ и воспаление. Далее была выдвинута гипотеза, основанная на усилении метаболической активности сетчатки после «спасения» фоторецепторов с помощью ГТ [4].

Сетчатка в состоянии дегенерации имеет меньшую потребность в кислороде и меньше снабжается кислородом. Большинство случаев дегенерации сетчатки, включая опосредованные мутациями *RPE65*, сопровождается истощением ее сосудов. Если такое состояние пониженного метаболизма внезапно изменится в результате вмешательства, приводящего к повышению функциональной активности фоторецепторов и, следовательно, всех клеток внутренней сетчатки, может ли дегенерирующая система с низким содержанием кислорода справиться с этим после многих лет дегенерации? То, что случаи ХРА наблюдались преимущественно у молодых взрослых пациентов и подростков с высоким уровнем «спасения» палочек, может указывать на причинно-следственную связь эффективности и безопасности. Если это так, то функциональное восстановление

¹³ <https://neovasculgen.info/instruktsiya-po-primeneniyu>

¹⁴ https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/upstaza-epar-public-assessment-report_en.pdf

дегенерированной ткани может привести к метаболическому и окислительному дисбалансу, что впоследствии приведет к гибели клеток [4]. Если эта гипотеза верна, то в худшем случае данная ГТ не просто не позволит сохранить зрение в течение взрослой жизни, но и после первых лет видимой эффективности приведет к ускоренной потере зрения по сравнению с нелечеными пациентами. Безусловно, это предположение требует большего времени наблюдательных КИ и большей выборки пациентов. Однако данный пример подчеркивает как опасность излишне упрощенного взгляда на ГТ, так и то, что восстановление функции дефектного гена должно рассматриваться с позиций системной биологии.

Определение терапевтического окна — важная часть разработки патогенетической терапии наследственных заболеваний

Большие ожидания направлены на ГТ наследственных заболеваний как на универсальный инструмент, позволяющий воздействовать на причину развития патологий. Критически важным для сохранения не только жизни, но и качества жизни пациентов является своевременное применение ГТ. Многие наследственные заболевания прогрессируют достаточно быстро и связаны с потерей функций, навыков, дисрегуляцией нормального клеточного и тканевого обмена, а также разрушением клеток и тканей, в норме экспрессирующих целевой белок. На поздних стадиях развития заболевания применение ГТ может оказаться неэффективным из-за необратимости изменений, произошедших в организме на фоне мутации и потери большей части клеток, являющихся мишенью терапии.

В связи с этим необходимо изучение естественного течения наследственного заболевания в каждом индивидуальном случае и определение «терапевтического временного окна» — наиболее благоприятного периода для лечения с восстановлением функций. В случае орфанных болезней изучение естественного течения осложняется небольшой выборкой и гетерогенностью пациентских групп, характерным для некоторых наследственных заболеваний разнообразием мутаций, влиянием на прогрессирование заболевания генов-модификаторов. Следует отметить, что определение оптимального возрастного периода для применения ГТ практически невозможно предсказать по результатам доклинических исследований. Последствия мутаций, которые вызывают

развитие патологий, не всегда воспроизводятся на животных моделях соответствующих заболеваний. К тому же довольно сложно аппроксимировать возраст животных и возраст пациентов.

Возможности применения ГТ на ранних сроках развития патологии, а тем более на пресимптоматической стадии неразрывно связаны с возможностями диагностики заболевания. Единственный на сегодня препарат Элевидис (деландистроген моксепарвовек) для заместительной ГТ миодистрофии Дюшенна одобрен Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) по ускоренному механизму для введения амбулаторным пациентам в возрасте 4–5 лет¹⁵. При этом средний возраст (медиана) установления диагноза среди пациентов с МДД равен 4,9 (4,8) года [7], а от появления первых признаков заболевания до установления диагноза проходит в среднем 2,2 года. Позднее применение ГТ может стать не только неэффективным, но даже опасным для пациентов. Известно о смертельных случаях применения ГТ у пациентов с МДД на поздних стадиях развития заболевания (16 и 27 лет) в рамках КИ (NCT03362502, NCT05514249).

На примере препарата Золгенсма (онасемноген абепарвовек) для лечения спинальной мышечной атрофии на группе пациентов в пресимптоматической стадии заболевания была продемонстрирована феноменальная эффективность своевременного проведенной ГТ. У всех 14 пациентов после введения препарата определены показатели по шкалам оценки двигательного развития на уровне здоровых детей на протяжении 18 мес. наблюдения [6]. Таким образом, наиболее адекватной стратегией диагностики редких наследственных заболеваний с целью применения ГТ на пресимптоматической стадии является неонатальный скрининг [6]. Отдельно стоит упомянуть ультраорфанные наследственные заболевания (со встречаемостью менее 1 на 1 000 000 новорожденных), для которых предпринимаются попытки проведения пациент-специфической генной терапии.

Принимая во внимание временные затраты на диагностику, в том числе генетическую, для установления диагноза и связи обнаруженного фенотипа с ультраредкими мутациями в геноме, возможность разработки эффективной ГТ на современном этапе научно-технического развития является труднореализуемой. В связи с этим требуется создание платформенных решений, позволяющих в короткие сроки

¹⁵ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/tissue-tissue-products/elevydys>

создавать и сканировать кандидатные препараты в пациент-специфических моделях и исследовать их безопасность [8].

Стратегии снижения риска возникновения побочных эффектов при введении генотерапевтических препаратов

Развитие тяжелых нежелательных явлений при применении ГенЛП на основе AAV часто ассоциировано с возникновением иммунного ответа на высокую дозу вирусного препарата или наличием у пациентов сопутствующих заболеваний [9]. В связи с этим существуют два направления по предотвращению возможных побочных эффектов: тщательный отбор пациентов и применение фармакотерапии для снижения потенциального иммунного ответа; модификация самого препарата для снижения дозы и удаления провоцирующих иммунитет факторов.

Пациентоориентированный подход

Считается, что AAV не патогенен для человека, тем не менее пациент может иметь историю контакта с природным серотипом AAV, в результате чего в его организме образуются иммунные клетки памяти. Учитывая быстрые и сильные иммунные реакции, которые индуцируются после формирования иммунологической памяти, необходимо идентифицировать и исключить лиц со сформированным адаптивным иммунитетом к конкретному серотипу AAV. Существующий иммунитет определяется путем выявления титров антител к определенному антигену, а пороговые значения титра используются как один из критериев отбора пациентов. Следует отметить, что среди разработчиков ГенЛП нет единого протокола определения предсуществующих антител. Варьируют как вид самого анализа, что приводит к выявлению разного типа антител (нейтрализующие, связывающие), так и пороговые значения [10]. Предельные значения титра антител часто определяются в доклинических исследованиях и после этого проверяются для клинического использования. Например, анализ трансдукции трансгена у макаков-резус после изолированной перфузии конечностей AAVrh74.MCK.micro-dys.FLAG показал, что у животных с ранее существовавшими титрами антител к AAVrh74 $>1:400$ наблюдалась сниженная экспрессия трансгена по сравнению с животными с титрами антител к AAVrh74 $\leq 1:400$ [10]. Эти доклинические исследования на приматах послужили основой для установления критериев отбора в последующих КИ. Разработка универсальных протоколов оценки пороговых значений

позволила бы оптимизировать применение ГТ и, вероятно, расширила бы группы пациентов, для которых такая терапия применима.

Возможные иммунные реакции на рекомбинантные вирусные векторы не ограничиваются адаптивным гуморальным иммунитетом. В связи с разнообразием таких реакций введение AAV препаратов при ГТ проводят в сочетании с системными кортикостероидами. Например, кортикостероиды назначались всем пациентам, получившим препараты Лукстурна, Золгенсма и Элевидис в течение 7, 30 и 60 сут соответственно. При проведении ГТ при гемофилии (Гемгеникс, Роктавиан) иммуносупрессия кортикостероидами проводится при повышении трансаминаз. На фоне такой терапии возможны иммуноопосредованные побочные эффекты, к тому же назначение системных иммуносупрессантов само по себе также может вносить свой вклад в развитие нежелательных явлений. Многие исследовательские работы посвящены подбору более эффективной и безопасной фармакотерапии для снижения иммунного ответа на AAV препараты [11, 12].

Подходы, направленные на модификацию препаратов

Для достижения эффективной трансдукции целевых клеток используется системное введение высоких доз рекомбинантных AAV вплоть до $1,33 \times 10^{14}$ геномных копий на килограмм (гк/кг) в случае препарата Элевидис (табл. 1). Одновременно с трансдукцией целевых клеток вирусный капсид и терапевтический ген могут попадать в нецелевые ткани и органы, провоцируя развитие побочных реакций. Так, нежелательная трансдукция печени может вызывать разрушение гепатоцитов, что клинически выражается в повышении в сыворотке крови уровня трансаминаз (АЛТ, АСТ), наиболее частом побочном эффекте при системном введении препаратов на основе AAV. Гепатотоксичность стала причиной нескольких смертельных случаев применения ГТ на основе AAV в КИ у пациентов с X-сцепленной миотубулярной миопатией и в наблюдательных пострегистрационных исследованиях у пациентов со спинальной мышечной атрофией [9]. В связи с этим в настоящее время проводятся исследования ГенЛП на основе AAV с модификацией капсидов и с введением генетических конструкций для увеличения трансдукции и уровня экспрессии в целевых клетках одновременно со снижением нецелевой доставки. В перспективе такая оптимизация может привести к уменьшению необходимой для достижения терапевтического эффекта

дозы препаратов и снижению связанной с препаратом токсичности, а также потенциально может способствовать сокращению расходов на производство.

Модификация аминокислотной последовательности капсидных белков. Одобренные в настоящее время и находящиеся на продвинутых стадиях КИ препараты ГТ созданы с использованием капсидов природных серотипов AAV человека (2, 5, 9) и приматов (rh74) (табл. 1). Для усиления тропизма к целевым тканям и придания других функций на основе природных серотипов AAV создаются новые генно-инженерные капсиды. Успехи в этом направлении стали возможны благодаря определению трехмерной структуры капсидов AAV [13, 15] и локализации позиций в капсидных белках для вставки экспонируемых пептидов, необходимых для процесса заражения клеток вирусом [15]. Например, положение после аминокислотного остатка Q588 в белке VP1, находящемся в вариабельном регионе VR-VIII капсида AAV9, было охарактеризовано как оптимальное для вставки экспонируемых пептидов для дальнейшей селекции модифицированных вариантов, обладающих повышенным тропизмом к мышечным клеткам. В работах двух исследовательских групп описаны варианты, эффективно трансдуцирующие клетки сердца, диафрагмы и скелетных мышц мышей и приматов: MyoAAV 2A и MyoAAV 4E [15] и AAVMYO [17]. При введении данных капсидов в дозах, на порядок меньших, чем стандартные, удавалось достичь уровня экспрессии трансгена, схожего с AAV9. Все лучшие выбранные варианты капсида включали трипептид Arg-Gly-Asp (RGD) в первых трех позициях встроенного семичленного пептида. Наиболее вероятным кандидатом для связывания RGD-пептида в мышцах является интегрин $\alpha 7 \beta 1$, который присутствует в избытке во всех типах мышц, является рецептором ламинина и играет важную роль в развитии и функционировании мышечных клеток. Однако с антигенными свойствами RGD-пептида может быть связана потенциальная проблема. В связи с этим было высказано опасение о вероятной более высокой иммуногенности MYO модификаций AAV [18]. Иммуногенность полученных капсидов не изучалась экспериментально ни в одной из групп, использующих RGD-экспонирующие варианты AAV, однако в дальнейшем предстоит определить, не нивелирует ли повышенная иммуногенность капсидов с RGD-пептидом эффект, достигнутый снижением дозы.

В пилотных экспериментах на животных моделях заболеваний перечисленные выше и другие генно-инженерные капсиды были

успешно использованы для коррекции фенотипа при МДД [16], X-сцепленной миотубулярной миопатии [19], болезни Помпе [20]. В исследованиях продемонстрировано, что повышение тропизма капсидов к мышцам снижает неспецифическое заражение гепатоцитов, что может иметь положительный эффект при клиническом применении ГенЛП [16].

При модификации капсида AAV2 для увеличения тропизма к сердцу с использованием пептидов THGTPAD и NLPGSGD выявлено значительное повышение эффективности заражения кардиомиоцитов при снижении уровня трансдукции нецелевых тканей, а также более низкая иммуногенность данных серотипов на мышах [21]. В эксперименте *in vivo* этот капсид превосходил широко используемый для доставки трансгенов в сердце AAV9 [21].

Направленная модификация капсидов AAV9 привела к созданию и новых нейротропных серотипов MDV1A и MDV1B, обеспечивающих эффективную доставку в нейроны на модели мышей, а также PAL-капсидов (proline arginine loop), показавших высокий уровень доставки в нейроны на модели приматов [22]. При этом капсиды, эффективные на мышах, не демонстрировали повышенного тропизма у приматов. PAL-серотипы обеспечивали небольшое достоверное увеличение экспрессии трансгена по сравнению с AAV9 при сниженной вирусной нагрузке в нецелевых органах, таких как печень, почки, легкие, тимус.

Следует отметить, что в перечисленных выше работах модификация капсидов для увеличения показателей трансдукции определенных типов клеток приводила также и к снижению уровня заражения нецелевых органов. Одновременно с этим предпринимаются направленные попытки точечных модификаций капсида с целью снижения уровня доставки (детаргетирования, *detargeting*) нецелевых органов, в первую очередь печени. В работе K. Adachi с соавт. [23] на основе данных проведенного скрининга мутантных капсидов AAV были обнаружены аминокислоты на поверхности AAV9, ответственные за трансдукцию тканей, в первую очередь печени. На основе этих данных были предложены новые варианты капсидов AAV, обладающих более низким накоплением в печени, например P504A/G505A-мутанты. При этом модификация снижала эффективность трансдукции и целевых органов, например сердца. Позже было продемонстрировано, что внесение упомянутых мутаций приводит к снижению уровня доставки в печень и в случае других созданных на основе AAV9 генно-инженерных капсидов. Серотип

AAVMYO-LD (liver detargeting, LD) заметно хуже накапливался в печени мышей по сравнению с исходным серотипом AAVMYO, однако вместе с этим снизилась и эффективность трансдукции диафрагмы, сердца и скелетных мышц. Кроме того, внесение LD-мутаций привело к снижению эффективности продукции вирусов в отличие от исходной модификации [17].

С помощью изменения аминокислотной последовательности экспонируемых пептидов удалось добиться того, что предсуществующие антитела к природным серотипам AAV не узнают их модифицированные варианты. В работе J. Nan с соавт. [24] с использованием подхода рационального дизайна получены мутанты с повышенной эффективностью трансдукции в сочетании со сниженной иммуногенностью. В качестве объекта исследования использовали капсиды AAV8 и AAVS3, обладающие естественным тропизмом к печени. Был проведен скрининг мутантов с измененным PLA-мотивом VP1/2, который участвует в высвобождении AAV из эндосом, и мутантов с изменениями последовательности аминокислот, подвергающихся N-гликозилированию. Полученные варианты обеспечивали более высокую эффективность трансдукции в клеточных линиях карциномы печени и первичных гепатоцитах, а также в других клеточных линиях тканей человека. Важно отметить, что все проверенные варианты показали меньшую чувствительность к нейтрализующим антителам *in vitro* и *in vivo*. Более того, профили антител после *in vivo* трансдукции модифицированными капсидами отличались от их родительских капсидов AAV [24].

Один из наиболее популярных подходов для модификации AAV основан на использовании N-ацетилгалактозамина (GalNAc). Рецептор асиалогликопротеина (ASGP-R), высокоэкспрессируемый на поверхности гепатоцитов, представляет собой углеводсвязывающий белок, который распознает и связывает GalNAc или остатки галактозы. В работе M. Mével с соавт. [25] был разработан метод химической модификации AAV с помощью GalNAc и показано значительное увеличение трансдукции гепатоцитов *in vitro* по сравнению с немодифицированным AAV. При введении мышам модифицированного AAV наблюдалась индукция меньшего уровня антикапсидных антител по сравнению с природными векторами AAV2. Универсальный подход, основанный на биоконъюгации, представляет значительный интерес для регуляции иммунореактивности и тропизма капсида AAV [25]. В другом исследовании также использовался подход химической модификации

реакционноспособных открытых остатков лизина. *In vitro* было показано, что капсид AAV9, модифицированный N-этилмалеимидом (NEM), усиливал экспрессию генов в культуре эндотелиальных клеток человека. *In vivo* при введении AAV9-NEM наблюдалось увеличение уровня трансдукции костного мозга и снижение трансдукции ткани печени по сравнению с немодифицированным AAV9 [26].

Для экранирования эпитопов AAV от нейтрализующих антител был предложен подход по созданию AAV, инкапсулированных во внеклеточные везикулы (EV-AAV). При использовании этого препарата для доставки генов в кардиомиоциты было продемонстрировано, что EV-AAV доставлял значительно больше геномных копий, чем немодифицированный AAV в присутствии нейтрализующих антител в левый желудочек человека, а также в кардиомиоциты, полученные из плюрипотентных стволовых клеток человека *in vitro* и в сердце мыши *in vivo*. Эффективность такой системы доставки была продемонстрирована на мышинной модели инфаркта на фоне предварительной иммунизации AAV [27].

Следует отметить, что за последние несколько лет создание нового генно-инженерного капсида перестало быть трудозатратной и длительной задачей. Все больше разработчиков отдают предпочтение таким вариантам в надежде на более высокую эффективность и безопасность, а также патентную защиту своих разработок.

Модификация генома рекомбинантного AAV.

Изменения генетической конструкции AAV могут быть внесены для увеличения уровня экспрессии, что в конечном счете может привести к снижению необходимой дозы препарата. Минимальными и достаточными элементами для контроля экспрессии трансгена являются промотор и сигнал полиаденилирования. Помимо них широко используются энхансеры, интроны и посттранскрипционные регуляторные элементы, которые в определенных комбинациях могут в разы увеличивать уровень экспрессии трансгена [28].

Эффективность генной терапии напрямую зависит от выбранного промотора, который контролирует экспрессию целевого гена. Сильные конститутивные промоторы небольшого размера способны обеспечивать высокие уровни экспрессии. Однако экспрессия, запускаемая ими в нецелевых клетках, способна вызвать активацию клеточных и гуморальных иммунных ответов на трансген. К тому же вирусные промоторы быстро метилируются во многих типах клеток, что приводит к снижению эффективности со

временем. Для первых одобренных AAV препаратов было характерно использование конститутивных промоторов (Глибера, Лукстурна, Золгенсма), а в более поздних разработках уже применялись тканеспецифичные печеночные (Роктавиан, Гемгеникс) и мышечные (Элевидис) промоторы (табл. 1). Для увеличения специфичности экспрессии трансгенов создаются новые высокоэффективные тканеспецифичные промоторы [29].

В ряде исследований *in vivo* продемонстрировано возникновение иммунной толерантности к трансгену при небольшом уровне его экспрессии в печени [30]. В работе P. Colella с соавт. [31] предложен подход комбинирования различных тканеспецифичных промоторных элементов для экспрессии терапевтических трансгенов как в тканях-мишенях, так и в гепатоцитах. С этой целью использовали энхансер аполипопротеина E, элементы промотора антитрипсина альфа-1 человека и короткий синтетический промотор *spC5.12*, который активен как в сердечной, так и в скелетных мышцах и ранее успешно применялся на крупных животных моделях мышечной дистрофии. Авторы показали, что использование эффективных tandemных промоторов предотвращало формирование иммунных ответов на трансген после системной доставки гена кислой альфа-глюкозидазы (GAA) с помощью AAV у иммунокомпетентных мышей линии *Gaa^{-/-}*. Также было продемонстрировано, что неонатальная генная терапия с помощью AAV8 или AAV9 у мышей *Gaa^{-/-}* приводила к стойкому терапевтическому эффекту при использовании tandemного печеночно-мышечного промотора (LiMP), который обеспечивал высокую и стабильную экспрессию трансгена. Данный промотор использовали также для доставки трансгена в составе генно-инженерного капсида AAV-MT (muscle transduction). Эта комбинация капсида и промотора с улучшенной экспрессией в мышечных клетках и специфичностью позволила обеспечить повышение клиренса гликогена в сердечных и скелетных мышцах взрослых мышей линии *Gaa^{-/-}*. У новорожденных *Gaa^{-/-}* мышей полное восстановление содержания гликогена и мышечной силы наблюдалось через 6 мес. после инъекции AAV [32].

Помимо традиционных подходов, основанных на повышении специфичности трансдукции и транскрипции, микроРНК-зависимое посттранскрипционное подавление становится новой эффективной технологией для регулирования экспрессии трансгена [33, 34]. МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК, чья экспрессия часто специфична для ткани или стадии дифференцировки.

Обычно они регулируют экспрессию генов путем связывания с комплементарными последовательностями в 3'-нетранслируемой области (UTR) мРНК. Для контроля экзогенной экспрессии трансгена tandemные повторы искусственных сайтов-мишеней микроРНК (miR-BS) обычно включают в 3'-UTR область экспрессионной кассеты трансгена, что приводит к последующей деградации транскрипта в клетках, экспрессирующих соответствующую микроРНК. Многие подходящие микроРНК, избирательно представленные в отдельных тканях, уже определены. В частности, микроРНК-122 – микроРНК, почти исключительно экспрессируемая в ткани печени. В нескольких исследованиях было показано успешное подавление экспрессии трансгена в печени, опосредованное микроРНК-122 [33]. Однако специфической экспрессии микроРНК может быть недостаточно для достижения сильного микроРНК-зависимого подавления экспрессии трансгена.

Важным звеном при формировании иммунного ответа являются антигенпрезентирующие клетки. С целью снижения трансгенспецифических иммунных ответов и разработки безопасных генетических конструкций в результате *in vitro* скрининга был подобрана комбинация микроРНК-142BS и микроРНК-652-5pBS, которая значительно подавляла экспрессию трансгена в антигенпрезентирующих клетках, но сохраняла высокий уровень его экспрессии в мышечных клетках. При внутримышечной доставке препаратов AAV1 с элементами микроРНК-142/652-5pBS были достигнуты более высокие уровни экспрессии трансгена, чем предыдущие конструкции, а также выявлено эффективное ингибирование активации цитотоксических Т-лимфоцитов и Th17 [35].

Для регулируемой экспрессии трансгена также предложен подход на основе РНК-интерференции. В работе M. Subramanian с соавт. [36] разработана конструкция, одновременно содержащая как короткую шпилечную РНК, так и сайты ее связывания. Для индукции трансгена использовали технологию REVERSIR – синтетический высокоаффинный олигонуклеотид, комплементарный направляющей цепи короткой шпилечной РНК, позволяющий подавить РНК-интерференцию и быстро восстановить экспрессию трансгена. Полученные результаты создают концептуальную основу для регулируемых переключателей на основе РНК-интерференции и динамической модуляции экспрессии генной терапии с возможностью снижения частоты дозирования в клинических условиях [36]. Для достижения регулируемой экспрессии трансгена

были апробированы и тетрациклин-зависимые промоторные элементы. Так, репортерная система на основе AAV1 была использована для оценки длительности экспрессии трансгена в ответ на доксициклин. Авторы продемонстрировали, что экспрессия целевого белка сохраняется вплоть до 5 лет после введения [37].

В работе X. Wu с соавт. [38] была предложена трансгенная система, индуцируемая мусконом (AAVMUSE), на основе мышинного обонятельного рецептора, связанного с G-белком (MOR215-1), и синтетического промотора, реагирующего на цАМФ. При воздействии триггера мускон связывается с MOR215-1 и активирует сигнальный путь цАМФ, инициируя экспрессию трансгена. Применение AAVMUSE обеспечивало зависимый от дозы и времени воздействия мускона контроль экспрессии люциферазы в печени или легких мышей в течение как минимум 20 нед. Была продемонстрирована эффективность системы AAVMUSE для коррекции фенотипа на моделях мышей с хроническими воспалительными заболеваниями: неалкогольная жировая болезнь печени и аллергическая астма [38].

Активация адаптивного иммунитета возможна посредством распознавания гипометилированных CpG мотивов доставленной генетической конструкции рецептором TLR9 (toll-like receptor 9), что в дальнейшем запускает образование цитотоксических Т-лимфоцитов. Повышение содержания CpG-мотивов часто достигается за счет оптимизации конструкций, например оптимизации кодонов. В доклинических и клинических исследованиях ГенЛП продемонстрирована зависимость развития цитотоксической иммунной реакции от содержания в препарате CpG-мотивов, которая, в свою очередь, приводила к быстрой потере трансгена [39, 40]. В работе J.F. Wright с соавт. [41] предложена методика количественной оценки потенциала генетической конструкции к активации TLR9 на основе содержания CpG-мотивов. Показано, что терапевтические AAV, близкие по содержанию CpG-мотивов к человеческому геному, наиболее безопасны для клинического применения. Помимо снижения содержания CpG-мотивов предложен вариант использования ДНК последовательностей, блокирующих TLR9 рецепторы [42].

Технология производства AAV: прошлое, настоящее и будущее

В настоящее время AAV являются золотым стандартом для препаратов генной терапии.

С момента регистрации первого препарата ГенЛП Глибера (2012, EMA)¹⁶ технология производства претерпела значительное усовершенствование. Основными драйверами модернизации являются ограниченные производственные мощности при текущей низкой производительности процесса, которые не в состоянии обеспечить постоянно растущие потребности в препаратах, и высокая стоимость курса терапии.

Транзиторная трансфекция плазмидной ДНК клеточной линии HEK-293 остается наиболее распространенным методом производства AAV. Обычно для трансфекции используются три плазмиды, первая из которых несет терапевтический ген интереса (gene of interest, *Goi*), вторая — гены капсида AAV и репликации (*rep/cap*) и третья хелперная — дополнительные гены аденовируса, необходимые для репликации AAV внутри клетки-хозяина HEK-293.

Первая технология производства представляла собой культивирование клеток, прикрепленных к стенке сосуда (адгезионная культура), с использованием среды, содержащей фетальную сыворотку крупного рогатого скота [43, 44]. По аналогии с эволюцией технологии производства моноклональных антител (mAb) такая технология трудно масштабируема из-за невозможности культивирования большого количества культуральных флаконов, роллерных бутылей, флаконов типа CellStack и др. [45, 46]. Первым шагом к масштабированию технологии культивирования стало появление биореакторов с неподвижным слоем микроносителей iCELLis™ (Pall), в которых площадь поверхности культуры в одном сосуде достигала 500 м² (эквивалентно 3000 роллерных флаконов площадью 1700 см²), обеспечивая при этом некоторую степень контроля процесса за счет поддержания достаточного газообмена, питательных веществ, а также уменьшения накопления метаболитов клеточной культуры, таких как аммиак и молочная кислота [47].

Тем не менее эти системы ограничены по площади поверхности, плотности клеток, которую можно достичь, и в конечном счете требуют дополнительного масштабирования для удовлетворения потребности в препаратах. Указанные ограничения, а также проблема использования компонентов животного происхождения способствовали дальнейшему совершенствованию технологии, что привело к появлению питательных сред для суспензионных культур клеток HEK-293 и позволило масштабировать технологию культивирования от настольных систем

¹⁶ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>

до биореакторов с осевым перемешиванием индустриального масштаба (до 2000 л) [48].

Параллельно с усовершенствованием технологии культивирования за прошедшее десятилетие в производстве ГенЛП произошли значительные изменения и в стадии очистки вирусных частиц. Можно выделить следующие основные тенденции: повышение доли содержания полных частиц за счет удаления как пустых капсидов, так и частично заполненных; более эффективная очистка от примесей (остаточная РНК и ДНК), связанных с процессом производства; повышение эффективности очистки для снижения производственных затрат. Одним из существенных достижений за последние годы стало появление аффинных сорбентов, позволяющих эффективно выделять вирусные частицы из клеточного лизата, в котором вирусные частицы являются минорным компонентом [49]. Более того, появились новые типы хроматографических сред, такие как монолитные или мембранные сорбенты, которые могут обеспечить более высокую производительность по сравнению с традиционными смолами. Одним из примеров является подход к разделению фаз системы жидкость-жидкость, основанный на связывании гидрофобного аффинного сорбента с вирусными частицами в клеточном лизате. Это сочетается с тангенциальной фильтрацией потока для получения очищенного материала [50]. Другим примером является одноразовая проточная система, в которой в рециркуляционном протоке используется хроматографическая смола. В этой системе различные технологические буферы смешиваются и могут циркулировать в потоке вместе с исходным лизатом. При их применении в оптимальной последовательности очищенный материал элюируется в отдельную емкость [51].

Разделение пустых и полных капсидов также является одним из направлений в очистке AAV, в котором достигнуты определенные успехи. В начале развития технологии единственным методом являлось ультрацентрифугирование в градиенте плотности CsCl или йодиксанола [52, 53], однако этот способ трудномасштабируемый и вызывает сложности с точки зрения требований GMP. Сложности с развитием хроматографических методов были связаны с тем, что разделение различных форм AAV возможно только по заряду, однако значения изоэлектрической точки у пустых, заполненных и частично заполненных крайне близки. Тем не менее за последние годы в этом направлении достигнут прогресс [53]. В частности, в совместном

исследовании АО «ГЕНЕРИУМ» и ООО «Марлин Биотех» по разработке ГенЛП на основе AAV удалось оптимизировать технологию очистки на основе анионообменной хроматографии, позволяющую производить препарат с 90% содержанием заполненных AAV. После этой стадии остается только один раунд препаративного центрифугирования, в гораздо меньшем масштабе, для того чтобы добиться чистоты, установленной разработчиком, в целевом профиле качества продукта. Предложенный подход значительно повышает возможности масштабирования и воспроизводимости процесса, а также отвечает всем современным требованиям GMP.

Несмотря на достигнутые успехи в области производства AAV, нерешенной проблемой по-прежнему остается высокая себестоимость производства, а следовательно, ограниченная доступность терапии для пациентов вследствие ее стоимости. Текущие усилия разработчиков направлены на повышение исходного титра AAV в процессе культивирования. В настоящее время можно выделить несколько основных трендов: совершенствование трехплазмидной технологии; использование модифицированного хелперного аденовируса; получение клеточной линии, в геном которой интегрированы гены для экспрессии AAV (для отхода от трансфекции клеток в каждом цикле производства).

Совершенствование плазмидной технологии заключается в поиске эффективных трансфекционных агентов, культуральных сред и подпиток, подборе клона родительской клеточной линии HEK-293 и оптимизации генетических конструкций плазмид pRepCap и pHelper. Примером такой технологии является платформа Xcite®AAV (Lonza). Согласно данным разработчиков платформа позволяет добиться повышения титра AAV в 2–8 раз в сравнении с коммерчески доступными плазмидами и клеточной линией¹⁷.

Вирусная трансдукция в качестве доставки генетического материала в клетку более эффективна и экономична, чем трансфекция плазмидами. Однако наличие дополнительного вирусного агента в производстве является нежелательным по соображениям безопасности. Исходя из того что жизненный цикл аденовируса состоит из двух фаз: ранней и поздней, разработчики технологии TESSA™ (OXGENE Ltd) сконструировали модифицированные рекомбинантные хелперные аденовирусы, у которых происходит самоингибирование главного позднего промотора (MLP), обеспечивая тем самым блокировку

¹⁷ <https://www.lonza.com/knowledge-center/cellgene/brief/AAV-production-HEK293-cell-line>

собственной репликации. Вставка сайта связывания репрессора тетрациклина (TetR) делает возможной нормальную репликацию вируса только в присутствии доксициклина, в отсутствие же доксициклина происходит только амплификация генома и экспрессия ранних генов хелперных функций. На первом этапе производства получают два хелперных аденовируса (один из которых кодирует гены *rep* и *cap* AAV, а второй – целевой ген AAV) в присутствии доксициклина. На втором этапе путем совместной инфекции клеток HEK-293 двумя хелперными аденовирусами в отсутствие доксициклина происходит наработка только AAV [55]. Важным преимуществом данной технологии является отсутствие необходимости производства большого количества плазмид. По данным разработчиков продуктивность технологии примерно в 30 раз выше, чем подхода на основе плазмид. Из недостатков можно отметить необходимость очистки финального продукта от хелперных аденовирусов.

Создание стабильных клеточных линий, продуцирующих AAV по аналогии с производством МАТ, является перспективным подходом для повышения продуктивности. Существенное техническое ограничение этого подхода – токсичность вирусных генов для самой экспрессионной системы. Разработчики платформы ELEVECTA™ (Cytiva) создали индуцибельные клеточные линии-продуценты AAV, основанные на использовании клеток HEK-293, в геном которых стабильно интегрированы хелперные гены аденовируса (*E2A*, *E4orf6* и *VA PHK*), а токсичный ген *rep* AAV индуцируется добавлением доксициклина (система индукции Tet-on). Интеграция гена *rep* в геном стала возможной благодаря инактивации промотора p19 при сохранении функциональности Rep78/68. Далее для получения финального стабильного продуцента AAV проводится трансфекция этой клеточной линии конструкцией с желаемой серотип-специфической *cap*-последовательностью, а также последовательностью гена интереса. Согласно данным разработчиков продуктивность перфузионного процесса на этой платформе составляет 10^{15} г/л с содержанием 30% заполненных капсидов [56]. Перспективные платформы биосинтеза AAV в сравнении с традиционной трехплазмидной технологией обобщены в таблице 2 (опубликована на сайте журнала¹⁸).

Таким образом, технология производства AAV является относительно молодым направлением,

проходящим все традиционные этапы развития биотехнологического производства рекомбинантных продуктов. В данном контексте уместна аналогия с эволюцией технологии производства МАТ. Технология производства AAV уже претерпела значительные изменения и продолжает совершенствоваться. Получившая наибольшее распространение плазмидная технология является стандартом в настоящее время, но уже заметен тренд на замещение ее новыми подходами с использованием рекомбинантных хелперных вирусов и стабильных клеточных линий. Кроме того, постоянно появляются новые среды, подпитки, сорбенты, фильтры и другое сырье. Возрастающая потребность в препаратах на основе AAV будет и в дальнейшем стимулировать совершенствование технологии, повышение продуктивности и снижение себестоимости, что в конечном счете будет способствовать большей доступности препаратов этого класса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ применения генной терапии наследственных заболеваний позволил выявить ряд барьеров биомедицинского и технологического характера, преодоление которых необходимо для дальнейшего развития данного направления. Для того чтобы сделать применение генной терапии оправданным с медицинской точки зрения и повысить ее доступность для пациентов, необходимо решить комплекс проблем, а именно:

- продемонстрировать долгосрочную эффективность генной терапии;
- определить оптимальное терапевтическое окно для вмешательства, особенно в случаях необратимых изменений при естественном прогрессировании наследственного заболевания;
- внедрить эффективную систему скрининга для раннего выявления наследственных заболеваний, для которых генная терапия возможна;
- разработать программу маршрутизации пациентов, учитывающую соотношение риска и пользы, для принятия решения о введении генотерапевтических лекарственных препаратов;
- путем модификации капсидов вирусов, генома вирусных векторов, подавления нецелевой экспрессии трансгена, применения новых специфичных промоторов повысить безопасность генотерапевтических лекарственных препаратов (в первую очередь путем снижения иммуногенности), увеличить эффективность

¹⁸ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-123-139-table2>

целевой доставки и снизить нецелевую доставку препаратов, достичь оптимального терапевтического уровня долговременной целевой экспрессии трансгена;

- путем разработки новых методов культивирования, очистки и трансфекции, а также путем создания новых клеточных линий-продуцентов повысить качество генотерапевтических препаратов на основе вирусных векторов и снизить себестоимость их производства.

Пути решения данных проблем должны быть определены как на доклинической стадии разработки, так и после первой демонстрации клинической эффективности генотерапевтических препаратов. Без системного решения этих проблем генная терапия на основе вирусных векторов не сможет войти в стандарты лечения не только по причине высокой финансовой нагрузки на здравоохранение, но и по причине ограниченной эффективности.

Литература/References

1. Мельникова ЕВ, Меркулов ВА, Меркулова ОВ. Генная терапия нейродегенеративных заболеваний: достижения, разработки, проблемы внедрения в клиническую практику. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):127–47. Melnikova EV, Merkulov VA, Merkulova OV. Gene therapy of neurodegenerative diseases: achievements, developments, and clinical implementation challenges. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):127–47 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-433>
2. Baas L, van der Graaf R, van Hoorn ES, Bredenoord AL, Meijer K. The ethics of gene therapy for hemophilia: a narrative review. *J Thromb Haemost*. 2023;21(3):413–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2022.12.027>
3. Fischer MD, Simonelli F, Sahni J, Holz FG, Maier R, Fasser C, et al. Real-world safety and effectiveness of voretigene neparvovec: results up to 2 years from the prospective, registry-based PERCEIVE study. *Biomolecules*. 2024;14(1):122. <https://doi.org/10.3390/biom14010122>
4. Stingl K, Kempf M, Jung R, Kortuem F, Righetti G, Reith M, et al. Therapy with voretigene neparvovec. How to measure success? *Prog Retin Eye Res*. 2023;92:101115. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2022.101115>
5. Thomas S, Conway KM, Fapo O, Street N, Mathews KD, Mann JR, et al. Time to diagnosis of Duchenne muscular dystrophy remains unchanged: findings from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network, 2000–2015. *Muscle Nerve*. 2022;66(2):193–7. <https://doi.org/10.1002/mus.27532>
6. Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, Saito K, Mendell JR, Servais L, et al. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with two copies of *SMN2* at risk for spinal muscular atrophy type 1: the Phase III SPR1NT trial. *Nat Med*. 2022;28(7):1381–9. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01866-4>
7. Motyl AAL, Gillingwater TH. Timing is everything: Clinical evidence supports pre-symptomatic treatment for spinal muscular atrophy. *Cell Rep Med*. 2022;3(8):100725. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100725>
8. Crooke ST. A call to arms against ultra-rare diseases. *Nat Biotechnol*. 2021;39(6):671–7. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00945-0>
9. Duan D. Lethal immunotoxicity in high-dose systemic AAV therapy. *Mol Ther*. 2023;31(11):3123–6. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.10.015>
10. Mendell JR, Connolly AM, Lehman KJ, Griffin DA, Khan SZ, Dharia SD, et al. Testing preexisting antibodies prior to AAV gene transfer therapy: rationale, lessons and future considerations. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2022;25:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.02.011>
11. Li X, Wei X, Lin J, Ou L. A versatile toolkit for overcoming AAV immunity. *Front Immunol*. 2022;13:991832. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.991832>
12. Arjomandnejad M, Dasgupta I, Flotte TR, Keeler AM. Immunogenicity of recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors for gene transfer. *BioDrugs*. 2023;37(3):311–29. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00585-7>
13. DiMattia MA, Nam HJ, Van Vliet K, Mitchell M, Bennett A, Gurda BL, et al. Structural insight into the unique properties of adeno-associated virus serotype 9. *J Virol*. 2012;86(12):6947–58. <https://doi.org/10.1128/jvi.07232-11>
14. Govindasamy L, Padron E, McKenna R, Muzyczka N, Kaludov N, Chiorini JA, Agbandje-McKenna M. Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4. *J Virol*. 2006;80(23):11556–70. <https://doi.org/10.1128/jvi.01536-06>
15. Börner K, Kienle E, Huang LY, Weinmann J, Sacher A, Bayer P, et al. Pre-arrayed Pan-AAV peptide display libraries for rapid single-round screening. *Mol Ther*. 2020;28(4):1016–32. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.02.009>
16. Tabebordbar M, Lagerborg KA, Stanton A, King EM, Ye S, Tellez L, et al. Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. *Cell*. 2021;184(19):4919–38.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.028>
17. Weinmann J, Weis S, Sippel J, Tulalamba W, Remes A, El Andari J, et al. Identification of a myotropic AAV by massively parallel *in vivo* evaluation of barcoded capsid variants. *Nat Commun*. 2020;11(1):5432. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19230-w>
18. Zolotukhin S, Trivedi PD, Corti M, Byrne BJ. Scratching the surface of RGD-directed AAV capsid engineering. *Mol Ther*. 2021;29(11):3099–100. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.10.020>
19. El Andari J, Renaud-Gabardos E, Tulalamba W, Weinmann J, Mangin L, Pham QH, et al. Semirational bioengineering of AAV vectors with increased potency and specificity for systemic gene therapy of muscle disorders. *Sci Adv*. 2022;8(38):eabn4704. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn4704>
20. Muñoz S, Bertolin J, Jimenez V, Jaén ML, Garcia M, Pujol A, et al. Treatment of infantile-onset Pompe disease in a rat model with muscle-directed AAV gene therapy. *Mol Metab*. 2024;81:101899. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2024.101899>
21. Rode L, Bär C, Groß S, Rossi A, Meumann N, Viereck J, et al. AAV capsid engineering identified two novel variants with improved *in vivo* tropism for cardiomyocytes. *Mol Ther*. 2022;30(12):3601–18. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.07.003>
22. Stanton AC, Lagerborg KA, Tellez L, Krunnusz A, King EM, Ye S, et al. Systemic administration of novel engineered AAV capsids facilitates enhanced transgene expression in the macaque CNS. *Med*. 2023;4(1):31–50.e8. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2022.11.002>

23. Adachi K, Enoki T, Kawano Y, Veraz M, Nakai H. Drawing a high-resolution functional map of adeno-associated virus capsid by massively parallel sequencing. *Nat Commun*. 2014;5:3075. <https://doi.org/10.1038/ncomms4075>
24. Han J, Zhu L, Zhang J, Guo L, Sun X, Huang C, et al. Rational engineering of adeno-associated virus capsid enhances human hepatocyte tropism and reduces immunogenicity. *Cell Prolif*. 2022;55(12):e13339. <https://doi.org/10.1111/cpr.13339>
25. Mével M, Bouzelha M, Leray A, Pacouret S, Guilbaud M, Penaud-Budloo M, et al. Chemical modification of the adeno-associated virus capsid to improve gene delivery. *Chem Sci*. 2019;11(4):1122–31. <https://doi.org/10.1039/c9sc04189c>
26. Mulcrone PL, Lam AK, Frabutt D, Zhang J, Chrzanowski M, Herzog RW, Xiao W. Chemical modification of AAV9 capsid with N-ethyl maleimide alters vector tissue tropism. *Sci Rep*. 2023;13(1):8436. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35547-0>
27. Li X, La Salvia S, Liang Y, Adamiak M, Kohlbrenner E, Jeong D, et al. Extracellular vesicle-encapsulated adeno-associated viruses for therapeutic gene delivery to the heart. *Circulation*. 2023;148(5):405–25. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.122.063759>
28. Powell SK, Rivera-Soto R, Gray SJ. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med*. 2015;19(102):49–57. PMID: PMC4505817
29. Скопенкова ВВ, Егорова ТВ, Бардина МВ. Мышечно-специфические промоторы для генной терапии. *Acta Naturae*. 2021;13(1):47–58. Скопенкова ВВ, Егорова ТВ, Бардина МВ. Muscle-specific promoters for gene therapy. *Acta Naturae*. 2021;13(1):47–58 (In Russ.). <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11063>
30. Markusic DM, Hoffman BE, Perrin GQ, Nayak S, Wang X, LoDuca PA, et al. Effective gene therapy for haemophilic mice with pathogenic factor IX antibodies. *EMBO Mol Med*. 2013;5(11):1698–709. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302859>
31. Colella P, Sellier P, Costa Verdera H, Puzzo F, van Wittenberghe L, Guerchet N, et al. AAV gene transfer with tandem promoter design prevents anti-transgene immunity and provides persistent efficacy in neonate Pompe mice. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;12:85–101. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.11.002>
32. Sellier P, Vidal P, Bertin B, Gicquel E, Bertil-Froidevaux E, Georger C, et al. Muscle-specific, liver-detargeted adeno-associated virus gene therapy rescues Pompe phenotype in adult and neonate *Gaa*^{-/-} mice. *J Inherit Metab Dis*. 2024;47(1):119–34. <https://doi.org/10.1002/jimd.12625>
33. Qiao C, Yuan Z, Li J, He B, Zheng H, Mayer C, et al. Liver-specific microRNA-122 target sequences incorporated in AAV vectors efficiently inhibits transgene expression in the liver. *Gene Ther*. 2011;18(4):403–10. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.157>
34. Geisler A, Fechner H. MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy. *World J Exp Med*. 2016;6(2):37–54. <https://doi.org/10.5493/wjem.v6.i2.37>
35. Muhuri M, Zhan W, Maeda Y, Li J, Lotun A, Chen J, et al. Novel combinatorial microRNA-binding sites in AAV vectors synergistically diminish antigen presentation and transgene immunity for efficient and stable transduction. *Front Immunol*. 2021;12:674242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674242>
36. Subramanian M, McIninch J, Zlatev I, Schlegel MK, Kaitanis C, Nguyen T, et al. RNAi-mediated rheostat for dynamic control of AAV-delivered transgenes. *Nat Commun*. 2023;14(1):1970. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37774-5>
37. Guilbaud M, Devaux M, Couzinié C, Le Duff J, Toromanoff A, Vandamme C, et al. Five years of successful inducible transgene expression following locoregional adeno-associated virus delivery in nonhuman primates with no detectable immunity. *Hum Gene Ther*. 2019;30(7):802–13. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.234>
38. Wu X, Yu Y, Wang M, Dai D, Yin J, Liu W, et al. AAV-delivered muscone-induced transgene system for treating chronic diseases in mice via inhalation. *Nat Commun*. 2024;15(1):1122. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45383-z>
39. Wright JF. Codon modification and PAMPs in clinical AAV vectors: the tortoise or the hare? *Mol Ther*. 2020;28(3):701–3. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.026>
40. Hamilton BA, Wright JF. Challenges posed by immune responses to AAV vectors: addressing root causes. *Front Immunol*. 2021;12:675897. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.675897>
41. Wright JF. Quantification of CpG motifs in rAAV genomes: avoiding the toll. *Mol Ther*. 2020;28(8):1756–8. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.07.006>
42. Chan YK, Wang SK, Chu CJ, Copland DA, Letizia AJ, Costa Verdera H, et al. Engineering adeno-associated viral vectors to evade innate immune and inflammatory responses. *Sci Transl Med*. 2021;13(580):eabd3438. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3438>
43. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*. 1998;72(3):2224–32. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.3.2224-2232.1998>
44. Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther*. 2003;7(6):839–50. [https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(03\)00095-9](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(03)00095-9)
45. Allay JA, Sleep S, Long S, Tillman DM, Clark R, Carney G, et al. Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial. *Hum Gene Ther*. 2011;22(5):595–604. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.202>
46. Wright JF, Wellman J, High KA. Manufacturing and regulatory strategies for clinical AAV2-hRPE65. *Curr Gene Ther*. 2010;10(5):341–9. <https://doi.org/10.2174/156652310793180715>
47. Powers AD, Piras BA, Clark RK, Lockey TD, Meagher MM. Development and optimization of AAV hFIX particles by transient transfection in an iCELLis® fixed-bed bioreactor. *Hum Gene Ther Methods*. 2016;27(3):112–21. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.021>
48. Taylor N. Pfizer ramps up bioprocessing capacity for DMD gene therapy trial. *BioPharma Reporter*; 2019. <https://www.biopharma-reporter.com/Article/2019/08/08/Pfizer-ramps-up-bioprocessing-capacity-for-DMD-gene-therapy-trial>
49. Florea M, Nicolaou F, Pacouret S, Zinn EM, Sanmiguel J, Andres-Mateos E, et al. High-efficiency purification of divergent AAV serotypes using AAVX affinity chromatography. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023;28:146–59. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.12.009>
50. Rebula L, Raspor A, Bavčar M, Štrancar A, Leskovec M. CIM monolithic chromatography as a useful tool for endotoxin reduction and purification of bacteriophage particles supported with PAT analytics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2023;1217:123606. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123606>
51. Haley J, Jones JB, Petraki S, Callander M, Shrestha S, Springfield E, Adamson L, Chilkoti A, Dzuricky MJ, Luginbuhl KM. IsoTag™AAV: an innovative, scalable & non-chro-

- matographic method for streamlined AAV manufacturing. *Cell Gene Ther Insights*. 2022;8(10):1287–1300. <https://doi.org/10.18609/cgti.2022.190>
52. Wada M, Uchida N, Posadas-Herrera G, Hayashita-Kinoh H, Tsunekawa Y, Hirai Y, Okada T. Large-scale purification of functional AAV particles packaging the full genome using short-term ultracentrifugation with a zonal rotor. *Gene Ther*. 2023;30(7–8):641–8. <https://doi.org/10.1038/s41434-023-00398-x>
 53. Strobel B, Miller FD, Rist W, Lamla T. Comparative analysis of cesium chloride- and iodixanol-based purification of recombinant adeno-associated viral vectors for preclinical applications. *Hum Gene Ther Methods*. 2015;26(4):147–57. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2015.051>
 54. Khanal O, Kumar V, Jin M. Adeno-associated viral capsid stability on anion exchange chromatography column and its impact on empty and full capsid separation. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023;31:101112. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2023.101112>
 55. Su W, Patricio MI, Duffy MR, Krakowiak JM, Seymour LW, Cawood R. Self-attenuating adenovirus enables production of recombinant adeno-associated virus for high manufacturing yield without contamination. *Nat Commun*. 2022;13(1):1182. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28738-2>
 56. Coronel J, Al-Dali A, Patil A, Srinivasan K, Braß T, Hein K, Wissing S. High titer rAAV production in bioreactor using ELEVECTA™ stable producer cell lines. In: *Proceedings of the ESGCT 2021 Digital Meeting, Virtual*, 19–22 October 2021.
 57. Penaud-Budloo M, François A, Clément N, Ayuso E. Pharmacology of recombinant adeno-associated virus production. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;8:166–80. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.01.002>
 58. Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):78. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01780-w>
 59. Liu P, Mayer A. Advances in recombinant adeno-associated virus production for gene therapy. *American Pharmaceutical Review*. 2022. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/589113-Advances-in-Recombinant-Adeno-Associated-Virus-Production-for-Gene-Therapy/>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Все авторы участвовали в разработке концепции обзора, написании текста рукописи, формулировке выводов.

Благодарности. Авторы благодарны В.В. Батрак и Р.А. Хамитову за обсуждение концепции обзора.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. All the authors participated in the development of the concept of this review, drafted the manuscript, and formulated the conclusions.

Acknowledgements. The authors are grateful to V.V. Batrak and R.A. Khamitov for discussing the review concept.

Об авторах / Authors

Егорова Татьяна Владимировна, канд. биол. наук / **Tatiana V. Egorova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3346-3242>

Пискунов Александр Александрович, канд. биол. наук / **Aleksandr A. Piskunov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>

Потеряев Дмитрий Александрович, канд. биол. наук / **Dmitry A. Poteryaev**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2695-8869>

Поступила 05.04.2024

После доработки 19.06.2024

Принята к публикации 21.06.2024

Received 5 April 2024

Revised 19 June 2024

Accepted 21 June 2024